Lane Medical Library

Aus dem klinisch-medizinischen Institut der II. medizinischen Klinik in München
Vorstand: Geh. Rat Prof. Dr. v. Müller

Versuche mit einer manometrischen Methode über die photochemische Wirkung des Serum und anderer Stoffe

INAUGURAL-DISSERTATION
ZUR
ERLANGUNG DER DOKTORWÜRDE
IN DER GESAMTEN MEDIZIN, VERFASST UND EINER
HOHEN MEDIZINISCHEN FAKULTÄT
DER BAYER. LUDWIG-MAXIMILIANS-UNIVERSITÄT
ZU MÜNCHEN

VORGELEGT VON
PAUL BRENNER
AUS MARKT-SCHWABEN

MÜNCHEN 1926
DRUCKEREI STUDENTENHAUS MÜNCHEN UNIVERSITÄT

Gedruckt (Original gekürzt) mit Genehmigung
der medizinischen Fakultät München.
Referent: Prof. Dr. Kämmerer.

Die von *O. Warburg* angegebene manometrische Methode ([1–8]) zu vergleichend-quantitativen Gasuntersuchungen erschien nach einer vorläufigen Mitteilung von *Gaffron* ([9]) auch zur Untersuchung von Porphyrin im menschlichen Serum gegenüber der chemisch-spektralanalytischen Methode von *H. Fischer* ([10] und [11]) so vorteilhaft, daß ein Wechsel der Methode angezeigt war.

Das Prinzip der Methode beruht darauf, daß bei einer chemischen Reaktion zwischen einer Verbindung in Lösung und dem darüber befindlichen Gas der Verbrauch desselben manometrisch gemessen wird. Bei den hier ausgeführten Versuchen wirkt das Porphyrin bei Anwesenheit von Licht als Katalysator (mündl. Mittlg.); es verbindet sich mit dem Serumeiweiß und überträgt Sauerstoff auf das Eiweiß.

Die gesamte Apparatur ist typisiert (Hanff und Buest, Berlin). Es wurden jedoch nur die unumgänglich notwendigen *Haldane-Barcroft*'schen Blutgasmanometer ([5]) mit den kästchenförmigen Vorlagen (Glasschliff) bezogen, die übrigen Bestandteile der Apparatur wurden im Institute und von einem Glasbläser hergestellt. Hiebei mußten verschiedene, meist formelle Abänderungen getroffen werden ([12]).

Die zur Durchführung des angegebenen Prinzipes notwendige Sättigung mit Sauerstoff wurde zunächst mit Alveolarluft (mündl. Mittlg.), dann aber stets mit Sauerstoff aus Bombe in drei Abschnitten durchgeführt. Hiezu wurden zwei Sauerstoffbomben benützt, die eine diente zur Sättigung der Flüssigkeit und des Gasraumes der Vorlagen, die andere zur Sättigung des Kapillarraumes, welche durch eine Verteilungsröhre gleichzeitig bei allen sechs Manometern ausgeführt werden konnte. Der anfangs beim Sättigen zur Vermeidung von Blasenbildung verwendete Heptylalkohol

mußte weggelassen werden, da Fällungen auftraten. Die Sättigung wurde insgesamt bei Zimmertemperatur durchgeführt, was technisch leichter durchzuführen war und bezüglich des Sättigens einen Sicherheitsfaktor darstellte, da die in der Flüssigkeit bei Zimmertemperatur absorbierte Menge Sauerstoff größer war als diejenige bei der Thermostatentemperatur (= 37° C) ([13]). Beim Einsetzen der Manometer in den Thermostaten mußte dann jedoch die Zeit des Temperaturausgleiches länger (45 Min.) gewählt werden, wobei ein öfteres Ablassen von Sauerstoff sich als notwendig erwies um schließlich auf einen als Nullpunkt gewählten Skalenteil (= 18) alle 6 Manometer mit einem ziemlich gleichen Überdruck einstellen zu können. Die Vorbereitungszeit (bis zur Ablesung der Nullpunktslage) betrug drei Stunden.

Die Berechnung der Versuche wurde nach der von *O. Warburg* ([5]; [8]) aufgestellten Formel durchgeführt, welche die in der Versuchszeit absorbierte Menge von Sauerstoff in cmm angibt. Zur besseren Vergleichsmöglichkeit wurde die minutliche Absorptionsmenge hieraus berechnet.

Bei den Vorversuchen ergaben sich zunächst zwei wichtige Fragen: 1. Sind im Serum nicht noch andere Stoffe enthalten, die ebenfalls eine photochemische Wirkung besitzen. 2. Kann die katalytische Wirkung des Porphyrin unter Lichteinwirkung noch in einem anderen chemischen Milieu bewiesen werden.

Zu 2. Die katalytische Eigenschaft des Porphyrin ist gut mit der *Nernst*'schen Definition ([14]) (unter Erweiterung durch *Noack* ([15])) über Katalysatoren in Einklang zu bringen. Zur Prüfung der Spezifität ([16]) dieser Eigenschaft wurden zunächst Versuche mit Gujaktinktur mit Wasserstoffsuperoxyd und Serum angestellt. Trotz Änderung der Konzentration der einzelnen Bestandteile der Mischung und Modifikation der Versuchsanordnung (Sauerstoffsättigung, künstliches und Tageslicht) konnte kein Ausschlag im Sinne der positiven Weberschen Blutprobe erhalten werden. Versuche mit der Indophenolblausynthese nach *W. H. Schultze* ([17]) in modifizierter Anwendung und mit Benzidin führten ebenfalls zu keinen Resultat. Die kata-

lytische Eigenschaft des Porphyrin konnte also in einem anderen Milieu nicht nachgewiesen werden; die Frage der Spezifität mußte offen gelassen werden.

Zu 1. Bezüglich anderer photochemisch wirkender Stoffe im Serum wurden die Gallenfarbstoffe zur Untersuchung herangezogen, da hierüber *Haußmann* ([18]) und *Meyer-Betz* ([19]) nicht ganz eindeutige Angaben machten. Es erwies sich, daß gewiße Gallenfarbstoffe eine erhöhte photochemische Wirkung besitzen.

Zu der nun notwendig erscheinenden Trennung von Porphyrin und Gallenfarbstoffen im Serum – es kommt hiebei nur Koproporphyrin in Frage ([20–27]) – schien eine von *Lehndorff* ([28–32]) zur quantitativen Bestimmung der Gallenfarbstoffe im Serum angegebene Extraktionsmethode geeignet. Bei dieser Methode werden die Gallenfarbstoffe aus dem Serum mittels Chloroform extrahiert (Koproporphyrin in Chloroform unlöslich). Wiederholt ausgeführte Extraktionsversuche von Serum mit künstlichen Gallenfarbstoffzusätzen ergaben jedoch, daß die Extrahierung nicht quantitativ vor sich geht; die Methode also im gegebenen Falle nicht brauchbar ist. Da keine andere chemische Trennungsmethode von Porphyrin und Gallenfarbstoffen gefunden werden konnte, so mußte um die Apparatur ausnützen zu können die Aufgabe der quantitativen Porphyrinbestimmung umgeändert werden in eine quantitative Bestimmung der photochemischen Wirkung des Serum.

Bei diesen Versuchen hat sich nun bei photochemisch wirkenden Stoffen ergeben, daß auch im Dunkeln eine Absorption von Sauerstoff stattfindet. Es mußte also auch diese gemessen werden, um durch Differenzbildung zwischen den Hell- und Dunkelversuchen diejenige Menge des absorbierten Sauerstoffes zu ermitteln, die allein auf Lichtwirkung zurückzuführen ist. Dadurch ergab sich eine Einteilung von 2 Hell-, 2 Dunkel- und 2 Kontroll- (Leer-) Manometern für eine Untersuchung eines Serum nachdem schon in früheren Versuchen festgestellt wurde, daß zur Bestimmung eines Wertes Mittelung von mehreren Manometer-Ausschlägen notwendig ist.

Bei diesen Versuchen traten manchmal sehr starke Wirkungen im Serum auf, die den Verdacht bakterieller Verunreinigung nahelegten. Das Serum wurde auf die allgemein übliche Weise unter aseptischen Kautelen gewonnen. Durch Ausgießen von Agarplatten konnte dann auch in diesen Fällen deutliche Infektion nachgewiesen werden, wobei jene Platten die mit Serum geimpft wurden, das im Thermostaten schon untersucht wurde, stärker infiziert sich zeigten, als jene, die mit noch nicht untersuchtem Serum geimpft wurden (Wirkung der Thermostatentemperatur). Nach längeren Versuchen über verschiedene Antiseptika erwies sich schließlich ein 1%iger Zusatz von 40%igem Formalin am geeignetsten ([33–37]).

Serienuntersuchungen.
(Tabelle 1 und 2.)

Bei der Versuchsserie über die photochemische Wirkung des Serum (Tab. 1) wurden aus klinischen und technischen Gründen stets 3 ccm Serum verwendet (pro Vorlage). Als Versuchszeit erwies sich eine neunstündige am vorteilhaftesten; die verhältnismäßig geringen Abweichungen hievon hindern die Vergleichsmöglichkeit kaum, da jeweils die minutlichen Absorptionsmengen ermittelt und verglichen wurden.

Da bei Vorversuchen mit Serum über den Zusammenhang von Fluoreszenz und photochemischer Wirkung bei verschiedenen Seren keine eindeutigen Ergebnisse zu erzielen waren, so wurden fluoreszierende und andere photochemisch wirkende Stoffe (Tab. 2) in einer Versuchsreihe verglichen ([38–40]). Als Eiweißlösung wurde hiefür eine künstliche, sterilisierbare Kaseïnlösung (*Hammarsten*) verwendet ([41]); ein Zusatz eines Antiseptikum erwies sich nicht als notwendig. Die verwendeten Stoffe wurden 1‰ig in Wasser gelöst und dann im Verhältnis 1:2 zu der Kaseïnlösung gegeben. Die Versuchszeit wurde dreistündig gewählt, soweit dies wegen vorzeitigem Erreichen der Meßgrenze der Manometer möglich war. Die Berech-

nung wurde analog den Serumuntersuchungen durchgeführt. Die Fluoreszenz der einzelnen Stoffe wurde in 10fach abgestuften wässerigen und Kaseïnlösungs-Verdünnungen durch Betrachtung gegen einen dunklen Gegenstand oder in einem schwarzausgestrichenen Kästchen (Licht fällt von oben ein; seitliche Betrachtung durch Sehschlitz) geprüft und festgestellt.

Die Prüfung der Genauigkeit der Methode mußte in einzelnen besonderen Untersuchungen durchgeführt werden, da die ersten 6-manometrigen Versuche (zunächst standen nur 2 Manometer zur Verfügung) sehr starke Abweichungen ergaben. Der Grund hiefür wurde in einer Undichtigkeit der Glasschliffe in Folge nachträglichen Anschleifens einer 2. Garnitur von Vorlagen gesucht. Versuche mit künstlichem Quecksilberverschluß und Prüfungen der einzelnen Manometer unter Anwendung des *Mariotte'* und *Guay-Lussac*'schen Gesetzes ergaben jedoch, daß die Glasschliffe als dicht anzusehen waren. Bei Verwendung sämtlicher Manometer als Thermobarometer ergab sich ein Schwanken von 1—3% um einen Mittelwert; bei Verwendung sämtlicher Manometer als Hellversuche ergab sich bei den absoluten Werten eine Streuung von 4—6% um eine Mittellage. Fehlerquellen, welche bei den verschiedenen Manipulationen enthalten sind, wurden soweit möglich, berechnet; die Beeinflußung des Resultates betrug null bis einige Prozente (unter Zugrundelegung von praktisch vorkommenden Fehlergrößen). Insgesamt waren schließlich durch verschiedene Kombination von Fehlern Schwankungen von 5—10% um einen Mittelwert als normal anzusehen; jedoch kamen manchmal noch stärkere Abweichungen vor.

Zusammenfassung.

Die bisher durchgeführten Untersuchungen haben in methodischer Beziehung ergeben:

1. Die manometrische Methode ist zur quantitativen Porphyrinbestimmung im Serum wegen der bisher nicht möglichen chemischen Trennung von Porphyrin und Gallen-

farbstoffen nicht geeignet, sie ist jedoch zur Bestimmung der photochemischen Wirkung des Serum und anderer Stoffe gut brauchbar.

2. Die klinische Anwendbarkeit für Serumuntersuchungen ist durch die relativ große Menge des Ausgangsmateriales (100 ccm Blut, von dem 15—30% brauchbares Serum zu erhalten ist, bei dem mit einem Verlust von 5—30% gerechnet werden muß) stark beschränkt. Dem Urteil von *Louros* ([42]) ist in dieser Beziehung beizupflichten.

Die Ergebnisse aus den als Demonstration der Methode aufzufassenden Serienuntersuchungen können bisher dahingehend zusammengefaßt werden:

1. Die photochemische Wirkung des Serum scheint bei manchen Fällen von *Ikterus* erhöht zu sein; Untersuchungen in dieser Richtung können differentialdiagnostisch von Bedeutung werden.

2. Die Eigenschaft der Fluoreszenz einer Lösung bildet noch keinen Anhaltspunkt für den Grad der Sauerstoffabsorption (vielleicht ganz übereinstimmend mit photochemischer Wirkung) im Vergleich mit anderen Lösungen von anderen photochemisch wirkenden, aber nicht fluoreszierenden Substanzen.

Zum Schlusse möchte ich mir erlauben Herrn Professor Dr. *Hugo Kämmerer* für die Überlassung des Themas, die tatkräftige Förderung der Arbeit, sowie die Durchsicht und Übernahme des Referates meinen ergebensten Dank auszusprechen.

Ferner möchte ich höflichst danken Herrn Geh.-Rat Prof. Dr. *Hans Fischer* für die Überlassung der verschiedenen Präparate und Unterstützung in chemischen Fragen, Herrn Prof. Dr. *Otto Warburg* für die Einführung in die manometrische Methode, sowie Herrn Prof. Dr. *Amandus Hahn* für allgemein methodische Ratschläge.

Die Beschaffung der Apparatur wurde durch Zuverfügungsstellung eines Kredites durch die Notgemeinschaft Deutscher Wissenschaft ermöglicht.

Literatur.

1. O. Warburg, Hoppe-Seyler's Zeitschrift für physiolog. Chemie. 1910. Bd. 69.
2. O. Warburg, Hoppe-Seyler's Zeitschrift für physiolog. Chemie. 1910/11. Bd. 70.
3. O. Warburg, Hoppe-Seyler's Zeitschrift für physiolog. Chemie. 1911/12. Bd. 76.
4. O. Warburg, Ergebnisse der Physiologie. 1914. Bd. XIV.
5. O. Warburg, Biochem. Zeitschrift. 1919. Bd. 100.
6. O. Warburg, Biochem. Zeitschrift. 1920. Bd. 103.
7. O. Warburg, Biochem. Zeitschrift. 1923. Bd. 142.
8. O. Warburg, Biochem. Zeitschrift. 1926. Bd. 152.
9. H. Gaffron, Die Naturwissenschaften 1925.
10. H. Fischer u. Zerweck, Hoppe-Seyler's Zeitschrift f. physiolog. Chemie. 1924. Bd. 132.
11. H. Fischer u. Zerweck, Hoppe-Seyler's Zeitschrift f. physiolog. Chemie. 1924. Bd. 138.
12. Ostwald-Luther, Hand- u. Hilfsbuch z. Ausführung physiko-chemischer Messungen.
13. Landoldt-Börnstein, Chemisch-physikalische Tabellen.
14. Nernst, Theoretische Chemie.
15. Noack, Zeitschrift für Botanik. 1920. 12. Jhrgg.
16. Willstätter u. Kuhn, Untersuchungen über Chlorophyll.
17. W. H. Schultze, Centralblatt f. Bakteriologie u. Parasitenkunde 1910. Bd. 56.
18. Haußmann, Fortschritte der naturwissenschaftlichen Forschung. 1912. Bd. VI.
19. Meyer-Betz, Deutsches Archiv f. klin. Medizin. 1913. Bd. 112.
20. H. Fischer, Münch. Med. Wochenschr. 1923.
21. H. Fischer u. Schneller, Hoppe-Seyler's Zeitschrift f. physiolog. Chemie. 1924. Bd. 135.
22. Willstätter, Berichte d. Deutsch. Chem. Gesellsch. 1922. 8.
23. Veil u. Weiß, Verhandlgn. d. Kongr. f. Inn. Med. 1923.
24. H. Kämmerer, Archiv f. Klin. Med. 1924. Bd. 145.
25. H. Fischer u. Hilmer, Hoppe-Seyler's Zeitschrift f. physiolog. Chemie. 1925. Bd. 133.
26. Schittenhelm, Handb. d. Krankh. d. Blutes. Bd. II. (Günther.)

27. Günther, Die Bedeutung der Hämatoporphyrine in Physiologie und Pathologie.
28. Lehndorff, Prager Med. Wochenschr. 1912.
29. Obermeyer u. Popper, Wiener Med. Wochenschr. 1910.
30. v. Jacksch, Verhandlgn. d. Kongr. für Inn. Med. 1891.
31. Schlesinger, Deutsch. Med. Wochenschr. 1903.
32. Posselt, Zentralbl. f. Inn. Med. 1907.
33. Kolle u. Hetsch, Die experiment. Bakteriologie u. d. Infektionskrankh. 1. Bd.
34, Flügge, Grundriß der Hygiene.
35. Hollemann, Lehrbuch der Chemie.
36. Mayer-Gottlieb, Experimentelle Pharmakologie.
37. Geppert, Berliner Med. Wochenschr. 1890.
38. Tappeiner u. Jodlbauer, Die sensibilisierende Wirkung fluoreszierender Substanzen.
39. W. Straub, Archiv für experimentelle Pathologie und Pharmakologie 1904.
40. W. Frei, Zentralblatt f. Haut- und Geschlechtskrankheiten 1925. Bd. XVIII.
41. cit. nach H. Kämmerer, Studien über Antitrypsine d. Serum. 1911.
42. Louros, Münch. Med. Wochenschr. 1926.

Lebenslauf.

Geboren wurde ich, Paul Brenner, am 22. 2. 1891 zu Markt-Schwaben als Sohn des Gutsbesitzers Matthias Brenner.

Zunächst besuchte ich die Volksschule in Markt-Schwaben und München, dann (ab 1902) die Real- und Oberrealschule und legte 1911 die Reifeprüfung in München ab.

Am 1. 10. 1911. trat ich als Einjährig-Freiwilliger beim Kgl. Bayer. 3. Feldartillerie-Regiment „Prinz Leopold" ein und ergriff dann die Offizierslaufbahn. Während des Weltkrieges machte ich, mit Ausnahme der Zeit meiner Verwundung, Dienst bei meinem Regimente; 1919 erhielt ich den erbetenen Abschied mit nachträglicher Charakterisierung als Hauptmann.

Nach dem Kriege studierte ich in München, Freiburg und München Medizin und legte im Frühjahr 1925 das Staatsexamen ab. Seitdem bin ich im Ambulatorium der II. medizinischen Klinik tätig.

Tabelle 1

Lfd. Nr.	Dat.	Klin. Diagnose:	Absorption pro Minute		Versuchs-dauer	Antiseptikum-Zusatz	Prüfung auf Bakterien-wachstum	Bemerkung:
			dunkel	hell (allein)	Std.			
1.	7. 5.	Hypertonie, Artskler.	—*)	0,04	8	—	—	*) nicht bestimmt.
2.	12. 5.	Hypertonie	—*)	0,02	6	—	nach 24 Std. mäßiges Wachstum	*) nicht bestimmt.
3.	15. 5.	Musk. Herzinsffz.	—*)	0,04	9	—	—	*) nicht bestimmt. Serum mit physiolog. Kochsalzlsg. auf 1/2 verdünnt; i. Berechnung berücksichtigt.
4.	11. 5.	Hypertonie, Artskler.	—*)	0,03	8	—	—	*) nicht bestimmt.
5.	19. 5.	Hypertonie*)	0,2	0,02	9	—	deutlich +	*) Serum war 9 Tage im Eisschrank gestanden.
6.	8. 5.	Hypertonie	0,04	0,04	8 1/4	—	schwach +	
7.	10. 5.	Katarrh. Ikterus	0,05	0,03	11	—	—	
8.	14. 5.	Ca. hepat. (Metast.) Ikterus	0,5	0,2	7 1/4	—	—	
9.	17. 5.	Hypertonie	0,05	0,02	9	—	—	
10.	18. 5.	Musk. Herzinsffz.*) Ca. hepat.	0,08	0,02	9	—	—	*) Versuch aus technischen Gründen nicht einwandfrei.
11.	20. 5.	Arteriosklerose*)	0,09	0,02	9	1% Trikresol	— (teilw. +)	*) da nach Trikresolzusatz leichte Fällung auftrat, so wurde filtriert.
12.	21. 5.	Arteriosklerose*)	0,05	0,02	9		—	
13.	28. 5.	Hypertonie	0,08	0,03	9	3 gtts Phenol	+	
14.	1. 6.	Nephrosklerose	0,1	0,03	9	1% Formalin (40%)	—	
15.	4. 6.	Lues latens*)	0,1	0,09	9	1% Formalin (40%)	—	*) Serum nach d. Schütteln: Hellversuche: milchig. Dunkelversuche: w.anfangs.
16.	5. 6.	Arteriosklerose	0,03	0,01	9	1% Formalin (40%)	—	
17.	8. 6.	Gen. Schrumpfniere	0,003	0,04	9	1% Formalin (40%)	—	

Tabelle 2

Lfd. Nr.	Dat.	Zusatz von:	Absorption pro Minute		Verdünnungen						Prüfung auf Bakterienwachstum	Bemerkung:
			dunkel	hell (allein)	1: 1000	1: 10000	1: 100000	1: 1 Mill.	1: 10 Mill.	1: 100 Mill.		
1.	11. 6.	Kaseïnlsg. allein (Hammarsten)	0,04	0,04							—	
2.	15. 6.	Trypaflavin (Cassella Frkft.) (2% Stammlsg.)	0,02	0,50	gefärbt Fluoreszenz					a)	—	*) Fällung mit Kaseïnlösung 1 : 300.
					*) gefärbt Fluoreszenz					b)		
3.	16. 6.	Methylenblau	0,01	5,0	gefärbt keine Fluoreszenz						—	
					gefärbt keine Fluoreszenz							
4.	17. 6.	Uroporphyrin	0,3*)	12,0	gefärbt keine Fluoreszenz						—	*) hier nicht Absorption von O, sondern Entstehen von Gas.
					gefärbt keine Fluoreszenz							
5.	30. 6.	Koproporphyrin	0,4*)	12,2	gefärbt keine Fluoreszenz						—	*) hier nicht Absorption von O, sondern Entstehen von Gas.
					gefärbt keine Fluoreszenz							
6.	22. 6.	Eosin	0,4	6,9	gefärbt Fluoreszenz						—	
					gefärbt Fluoreszenz							
7.	23. 6.	Fuchsin (Verdünnung 1:300000)	30,0	0,0 ?	*) gefärbt keine Fluoreszenz						—	*) nicht löslich. Fraglicher Versuch; es konnte zwisch. Hell- und Dunkelversuchen eine Diffz. nicht einwandfrei gebildet werden.
					gefärbt keine Fluoreszenz							
8.	18. 6.	Rindergalle (ca. 2 Monate i. Dunkeln steril aufbewahrt).	0,05	0,05	nicht gefärbt keine Fluoreszenz						—	
					nicht gefärbt keine Fluoreszenz							
9.	21. 6.	Kryptosäure*) (H. Fischer)	0,2	0,08	gefärbt keine Fluoreszenz						—	*) z. Herstellung einer 1‰ Lsg. (20 ccm) wurden 3 gtts NH_4OH dazu gegeben.
					gefärbt keine Fluoreszenz							
10.	28. 6.	Bilirubin*) (H. Fischer)	0,3	0,1	gefärbt keine Fluoreszenz						—	*) z. Herstellung einer 1‰ Lsg. (20 ccm) wurden 6 gtts NH_4OH dazu gegeben.
					gefärbt keine Fluoreszenz							
11.	25. 6.	Mesobilirubin*) (H. Fischer)	0,5	0,1	gefärbt keine Fluoreszenz						— (Luftinfekt. b. Ausgießen)	*) z. Herstellung einer 1‰ Lsg. (20 ccm) wurden 3 gtts NH_4OH dazu gegeben.
					gefärbt keine Fluoreszenz							
12.	24. 6.	Mesobilirubinogen*) (H. Fischer)	0,03	0,2	gefärbt keine Fluoreszenz						—	*) z. Herstellung einer 1‰ Lsg. (20 ccm) wurden 3 gtts NH_4OH dazu gegeben.
					gefärbt keine Fluoreszenz							

a) = Verdünnungen in Wasser; b) = Verdünnungen mit Kaseïnlösung 1 : 2.